Aus der 1. Inneren Abteilung des städt. Krankenhauses
Berlin - Neukölln

Wirkung von Serum bei einer beginnenden chronischen myeloischen Leukämie auf die Proliferation menschlichen Knochenmarkes in vitro

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Albrecht Freiherr von Beust
aus Hamburg

1975

Aus der 1. Inneren Abteilung des städt. Krankenhauses
Berlin - Neukölln

Wirkung von Serum bei einer beginnenden chronischen myeloischen Leukämie auf die Proliferation menschlichen Knochenmarkes in vitro

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Albrecht Freiherr von Beust
aus Hamburg

Referent: Professor Dr. med. Irene Boll

Korreferent: Professor Dr. med. Heinrich Gerhartz

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 22.9.1975

Druck: Zentrale Universitätsdruckerei, V a A 4

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I	Fragestellung	5
II	Material und Methode	7
III	Ergebnisse	12
IV	Diskussion	30
V	Zusammenfassung	34
VI	Literaturverzeichnis	35

Fragestellung

Ein normales Myelogramm zusammen mit einem normalen Blutbild kann als Ausdruck eines Gleichgewichtes zwischen Blutzellbildung und Blutzelluntergang gewertet werden. Der Markbefund allein genügt nicht zur Beurteilung dieses Gleichgewichtes, da er von der Ausschwemmung bestimmter Zellarten ins Blut beeinflußt wird. Bei Versuchen in vitro erfolgt keine Ausschwemmung, daher erlauben zeitlich aufeinanderfolgende Stichproben von kultiviertem Knochenmark Aussagen über seine Proliferationsaktivität.

Eine besondere Form der Gleichgewichtsstörung ist die chronisch-myeloische Leukämie oder chronische Myelose, von HEILMEYER definiert als "... ein Krankheitsbild, das durch eine irreversible Wucherung leukozytärer Zellen in verschiedenen Graden der Reife und der Abartung sowohl in den normalen Bildungsstätten, aber auch außerhalb derselben, mit oder ohne Ausschwemmung in das strömende Blut gekennzeichnet ist."

Für verschiedene Faktoren ist nachgewiesen worden, daß sie chronische Myelosen hervorrufen können.

Dazu gehören energiereiche Strahlung (FURTH u. FURTH, SCHWARTZ u.EHRLICH, HOSHINO et al.) sowie Chemikalien wie Benzpyren und Methylcholanthren (FURTH u. FURTH, MORTON u. MIDER zit.n. STORTI u. MAURI).

1908 gelang es ELLERMANN u. BANG, die Hühnerleukämie von Tier zu Tier zu übertragen und später nahmen FURTH u.KAHN auch bei Säugetieren eine Übertragung vor, indem sie intakte leukämische Zellen von erkrankten auf gesunde Mäuse übertrugen. Durch Plasma, Gewebsextrakte oder geschädigte Zellen gelang ihnen die Übertragung nicht. FLY u. GRAFFI induzierten bei Mäusen Leukämien, indem sie ihnen das mehrfach zellfrei passagierte Virus einer chronisch-myeloischen Maus übertrugen. Im Plasma von Patienten, die an einer chronischen Myelose litten, fanden LEVINE et al. virusartige Substanzen, die bei nicht-leukämischen Patienten nicht zu finden waren.

Die Wucherung der leukozytären Zellen läßt sich am erhöhten G/E-Index ablesen (HEILMEYER, REISNER jr. (25)). Der Mitoseindex in der Granulopoese ist eher erniedrigt (BOLL (3, 6), FLIEDNER, MAUBACH, ROHR, ROSIN).

Bei Versuchen in vitro zeigen die Reifungskurven beim Knochenmark chronischer myeloischer Leukämien eine verzögerte Ausreifung (BOLL (7)). In den karyologischen Kurven sind die Prophasen als Zeichen der erhöhten Regeneration vermehrt (FIESCHI, MAUBACH).

Die Kultivierung von Knochenmark eines Spenders mit chronischer myeloischer Leukämie im Blutplasma einer gesunden Versuchsperson verursacht eine Reifungshemmung (BOLL et al. (4), GERHARDT). Zugabe von Serum bei chronischer Myelose zu normalem Knochenmark stimuliert in vitro die Granulopoese, was sich in einer Vermehrung und Vergrößerung von Zellklumpen, wie auch in einer vergrößerten Anzahl von Myelozyten und polymorphkernigen Leukozyten äußert (REISNER jr. (24, 25)). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß im Humanserum bei chronischer myeloischer Leukämie Substanzen existieren, welche die Proliferation menschlichen Knochenmarkes beeinflussen. Es soll geprüft werden, ob durch Zugabe von Serum eines Patienten mit beginnender chronischer Myelose eine Proliferationsänderung von nicht-leukämischem Knochenmark hervorzurufen ist. Dazu wurde weitgehend normales Knochenmark in dem Serum einer unbehandelten beginnenden chronischen myeloischen Leukämie kultiviert. Als Kontrolle dienen Kulturen, bei denen statt Myeloseserum Eigenserum der jeweiligen Knochenmarkspender verwendet wurde.

II Material und Methode

Für die Versuche wurden insgesamt fünf Patienten mit annähernd normalen Knochenmarkbefunden ausgewählt. Nachdem das Mark durch Sternalpunktion gewonnen war, wurde ein Teil der aspirierten Bröckchen sofort ausgestrichen und nach PAPPENHEIM angefärbt. Der Rest des Punktats wurde in eine Heparin - Hanks - Lösung überführt.

Die Kultivierung erfolgte nach der von BOLL (3) modifizierten Carrelschen Deckglasmethode: Eigenplasma des Patienten wurde mit Corhormon(R) und 40 % Serum gemischt und zur Coagulation gebracht. Auf das Coagulum wurden die Knochenmarkbröckchen und darauf ein Tröpfchen Serum gesetzt. Das Ganze wurde mit einem Hohlschliffobjektträger bedeckt. Durch Umdrehen entstand die Kultur auf dem hängenden Coagulumtropfen, die im Brutschrank bei 37°C inkubiert wurde. Nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden wurden die Kulturen ausgestrichen und nach PAPPENHEIM gefärbt.

Das Fremdserum für die Kultur stammt von einer Patientin mit einer unbehandelten, beginnenden chronischen myeloischen Leukämie. Für die Kontrollreihen wurde Eigenserum des jeweils punktierten Patienten verwendet.

Auswertung der Präparate

Insgesamt wurden von jedem Präparat zweitausend Zellen ausgewertet, indem das Präparat meanderförmig durchgemustert und die im Blickfeld befindlichen Zellen differenziert wurden.

Einteilung der Zellen

Nach BOLL (3, 5) wurden folgende Zelltypen unterschieden: In der weißen Reihe Myeloblast, Promyelozyt, Myelozyt, Metamyelozyt, stabkerniger und segmentkerniger Granulozyt. Die basophilen und eosinophilen Formen wurden, der besseren Übersichtlichkeit halber, den entsprechenden neutrophilen Formen zugeordnet, da sie wegen ihrer kleinen Anzahl keine Aussage erlaubten.

In der roten Reihe wurden unterschieden: Proerythroblast, basophiler, polychromatischer, oxyphiler und reifer Erythroblast.

Außerdem wurde die Anzahl der Lymphozyten, Plasmazellen, Retikulumzellen, sowie der Megakaryozyten, bzw. -blasten bestimmt. Die Auswertung beschränkte sich jedoch auf die Zellen der Erythro- und Granulopoese.

Mitosen

Bei der Bestimmung der Mitosephasen wurde der Einteilung von BOLL (2, 3) gefolgt:
Die Prophase erkennt man an der Auflösung von Kernmembran und der vergröberten Kernstruktur. Bei der frühen Metaphase sind die Chromosomen über die ganze Zelle verteilt, um sich in der späten Metaphase zum Monaster, bzw. zur Äquatorialplatte anzuordnen. Nun erfolgt die Verdoppelung des Chromosomensatzes, und beide Sätze weichen in Richtung Spindelpole auseinander. In dieser Phase, der Anaphase, zeigen sich zwei Äquatorialplatten oder ein Diaster. Während der Telophase erfolgt die Durchschnürung des Cytoplasmas; die Kerne stellen sich als lockeres Dispirem dar. Als Rekonstruktionsphase bezeichnen wir die Phase, während der sich um das feste Dispirem eine Membran bildet und die Durchschnürung des Cytoplasmas vollendet wird.

Bestimmt wurde weiterhin der Mitoseindex, der die Anzahl in Mitose befindlicher Zellen pro tausend teilungsfähiger Zellen angibt. Als teilungsfähig wurden folgende Zellen zu Grunde gelegt:
Für die rote Reihe der Proerythroblast, der basophile, der polychromatische und der oxyphile Erythroblast, sowie für die weiße Reihe die granulozytären Vorstufen einschließlich des Metamyelozyten.

Die Durchschnittswerte aller Mitoseindices von Versuch und Kontrolle wurden graphisch gegenübergestellt.

Die karyologischen Kurven stellen die prozentuale Verteilung der einzelnen Mitosephasen dar.

In den Reifungskurven ist die prozentuale Zellverteilung der Granulo- bzw. Erythropoese im Originalpräparat, sowie in den 24-, 48- und 72-Stunden-Kulturen prozentual additiv aufgetragen.

Der G/E-Index gibt das Verhältnis von Granuloblasten und -cyten zu allen Erythroblasten an.

Bei den graphischen Darstellungen wurden folgende Symbole und Abkürzungen verwendet:

----- = Versuch (Kultur mit Myeloseserum)
——— = Kontrolle (Kultur mit Eigenserum)
rMI = roter Mitoseindex
wMI = weißer Mitoseindex
PRO = Proerythroblast
BE = basophiler Erythroblast
PE = polychromatischer Erythroblast
OE = oxyphiler Erythroblast
RE = reifer Erythroblast
MY = Myelocyt
PM = Promyelocyt
MM = Metamyelocyt

ST = stabkerniger Granulocyt
SEG = segmentkerniger Granulocyt
P = Prophase
fM = frühe Metaphase
sM = späte Metaphase
A = Anaphase
T = Telophase
R = Rekonstruktionsphase

Das Serum für die Versuchsreihe stammt von der 62-jährigen Hilde N., bei der auf Grund folgender Untersuchungsergebnisse eine chronisch-myeloische Leukämie im Anfangsstadium diagnostiziert wurde:
Die Patientin klagte über Schwäche, Kopfschmerzen und Belastungsdyspnoe. Es fand sich ein Milztumor von 2 Querfingern.
Folgende 4 Blutbilder wurden in 2-monatigem Abstand angefertigt:

	1.	2.	3.	4.
Leukozyten (pro ul):	25000	20000	15300	18100
bas (in %) :	6	1	5	5
eos :	2	1	5	0
PM :	4	1	2	6
MY :	4	1	0	6
MM :	1	0	6	5
ST :	7	6	5	5
SEG :	64	69	68	47
LYMPH :	10	9	9	21
MONO :	2	1	0	1
Erythrozyten (mill/ul):	5,14	4,07	3,61	4,84
Hb (in g%) :	14,8	13,0	11,6	14,5

Die alkalische Leukozytenphosphatase war zu jedem Zeitpunkt negativ.

Das Sternalpunktat ergab eine vermehrte Granulopoese mit relativ verminderter Erythropoese (G/E-Index = 11), außerdem fielen zahlreiche Mikrokaryozyten auf.
Die Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 1 nach MIESKE) zeigt nach 48 und 72 Stunden eine verzögerte Ausreifung, wie sie nach BOLL (3) für die chronische myeloische Leukämie typisch ist.

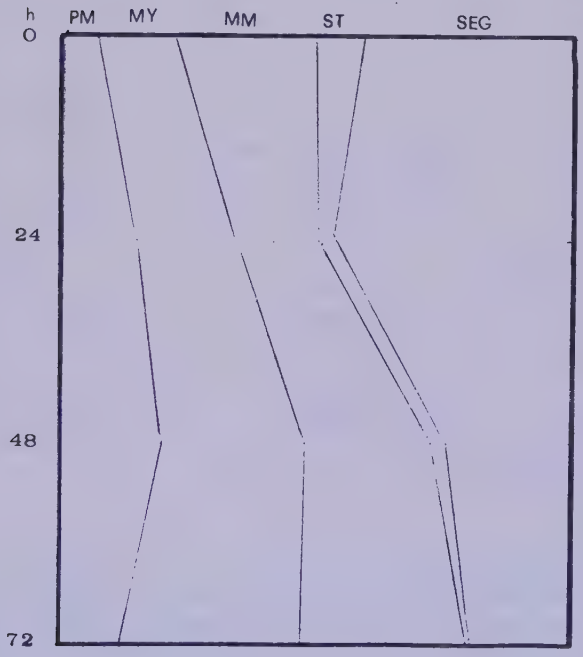

Abb. 1 Reifungskurve der Granulopoese bei Hilde N.
(n. MIESKE)
Ordinate: Inkubationszeit der Kulturen in Stunden
Abszisse: Prozentualer Anteil der einzelnen Reifungsstufen additiv aufgetragen.
Erläuterungen der Abkürzungen s.S. 9 u. 10

III Ergebnisse

Versuch 1 mit Knochenmark des Patienten
Hermann Sch., 72 Jahre

Diagnose: Prostatakarzinom

Blutbild vor der Punktion:

Leukozyten	:	8500/ul
bas	:	- %
eos	:	2
PM	:	-
MY	:	-
MM	:	-
ST	:	2
SEG	:	74
LYMPH	:	14
MONO	:	8

Erythrozyten:		3,62 mill/ul
Hb	:	11,2 g%
Hb_E	:	30,5 pg

Therapie vor der Punktion:

Lanicor(R)	3 X 0,25 mg
Endoxan(R)	3 X 50 mg

Reifungskurve: (Abb. 2)
Auffällig ist bei der Erythropoese der große Anteil der oxyphilen Erythroblasten, der nach 24 und 48 Stunden bei Fremdserumzusatz fast 40 % der gesamten erythropoetischen Zellen ausmacht. Bei der Granulopoese ist nach 24 Stunden eine Verminderung der teilungsfähigen Vorstufen in der Versuchsreihe zu beobachten. Nach 48 Stunden ist nur ein geringer Unterschied zu der Kontrolle vorhanden, während nach 72 Stunden der Anteil der reifen Zellen in der Versuchsreihe wesentlich höher ist als bei der Kontrolle.

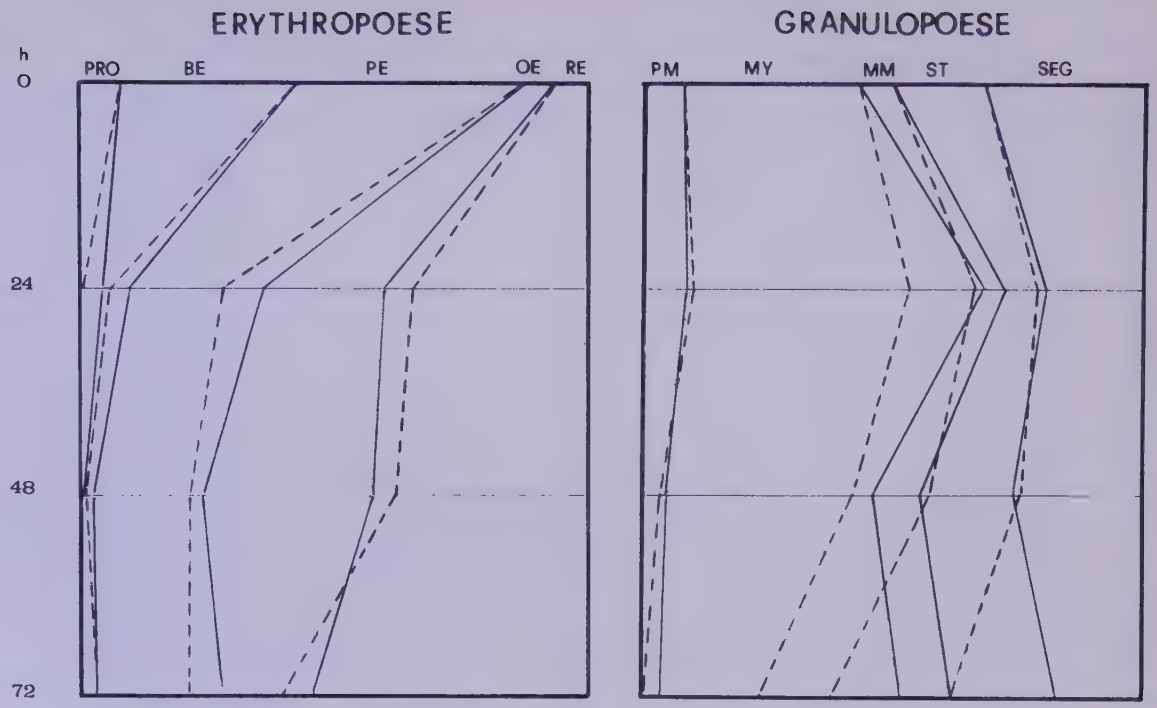

Abb.2 Reifungskurven der Knochenmarkzellen in Versuch 1
(Erläuterung der Zeichen und Abkürzungen s.S. 9 u. 10)

Versuch 2 mit Knochenmark des Patienten
Walter H., 69 Jahre

Diagnose: Pneumonischer Prozeß im linken Oberlappen, Pyelonephritis.

Blutbild vor der Punktion:

Leukozyten	:	9500/ul
bas	:	1 %
eos	:	-
PM	:	1
MY	:	-
MM	:	1
ST	:	1
SEG	:	78
LYMPH	:	14
MONO	:	4

Erythrozyten	:	3,66 mill/ul
Hb	:	11,3 g%
Hb_E	:	30,5 pg

Therapie vor der Punktion:

Lanicor(R)	2 X	0,25	mg
Binotal(R)	4 X	750	mg
Bisolvon(R)	3 X	8	mg

Reifungskurven: (Abb. 3)

In der Erythropoese zeigt die Versuchsreihe eine stärkere Ausreifung als die Kontrolle. Bei der Granulopoese sieht man in der Versuchsreihe nach 24 Stunden einen vermehrten Anteil der teilungsfähigen Vorstufen gegenüber den Kontrollen, während sie nach 72 Stunden mehr reife Zellformen zeigt.

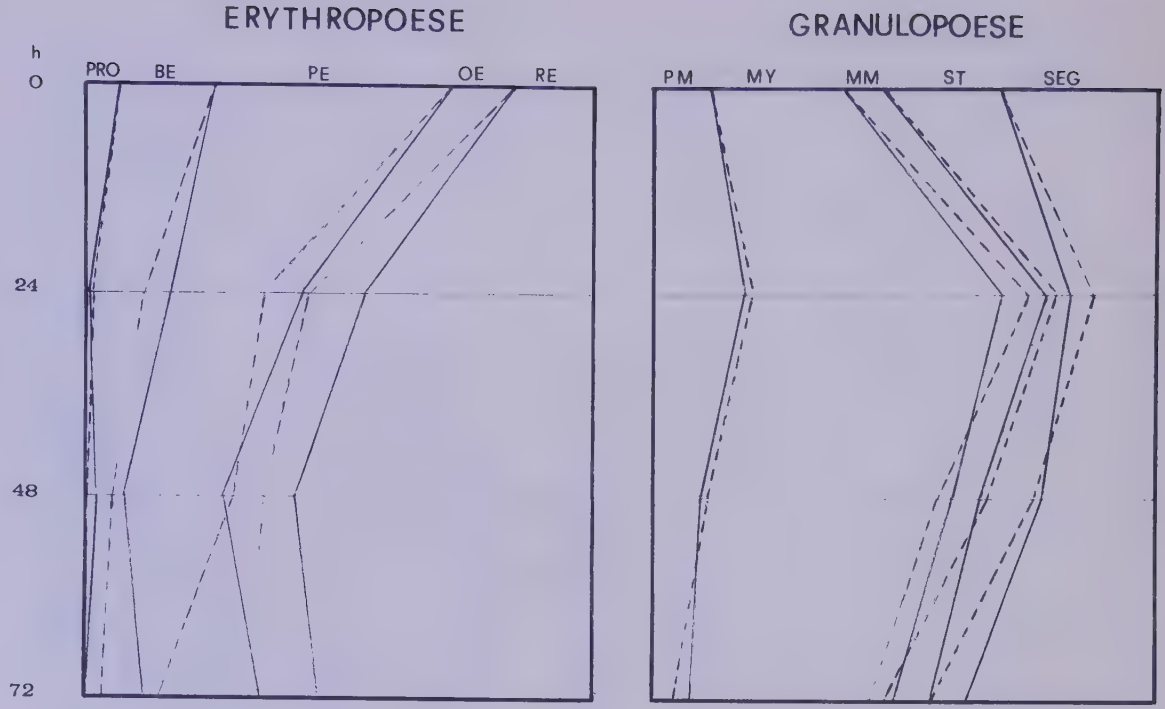

Abb.3 Reifungskurven der Knochenmarkzellen in Versuch 2
(Erläuterung der Zeichen und Abkürzungen s.S. 9 u. 10)

Versuch 3 mit Knochenmark des Patienten
Fritz D., 65 Jahre

Diagnose: Metastasierendes Bronchialkarzinom

Blutbild vor der Punktion:

Leukozyten	:	7700/ul
bas	:	- %
eos	:	4
PM	:	-
MY	:	-
MM	:	-
ST	:	-
SEG	:	70
LYMPH	:	21
MONO	:	5

Erythrozyten:		5,13 mill/ul
Hb	:	13,9 g%
Hb_E	:	25,1 pg

Therapie vor der Punktion:

Lanicor(R)	2 X 0,25	mg
Perphyllon(R)	3 X 1	Tabl.
Beromycin(R)	3 X 4 Mill	IE
Chinidin-Duriles(R)	3 X 250	mg
BAY b 4982	1 X 3	g, erstmalig am Tage vor der Punktion.

Reifungskurven: (Abb. 4)

Bei der Erythropoese zeigt die Versuchsreihe nach 24 Std. gegenüber der Kontrolle einen größeren Anteil reifer Zellen, während nach 48 und 72 Stunden die unreifen Vorstufen überwiegen. Die Granulopoese zeigt in den Kontrollen uneinheitliches Verhalten, aber zu allen Zeiten ist sie gegenüber der Versuchsreihe linksverschoben.

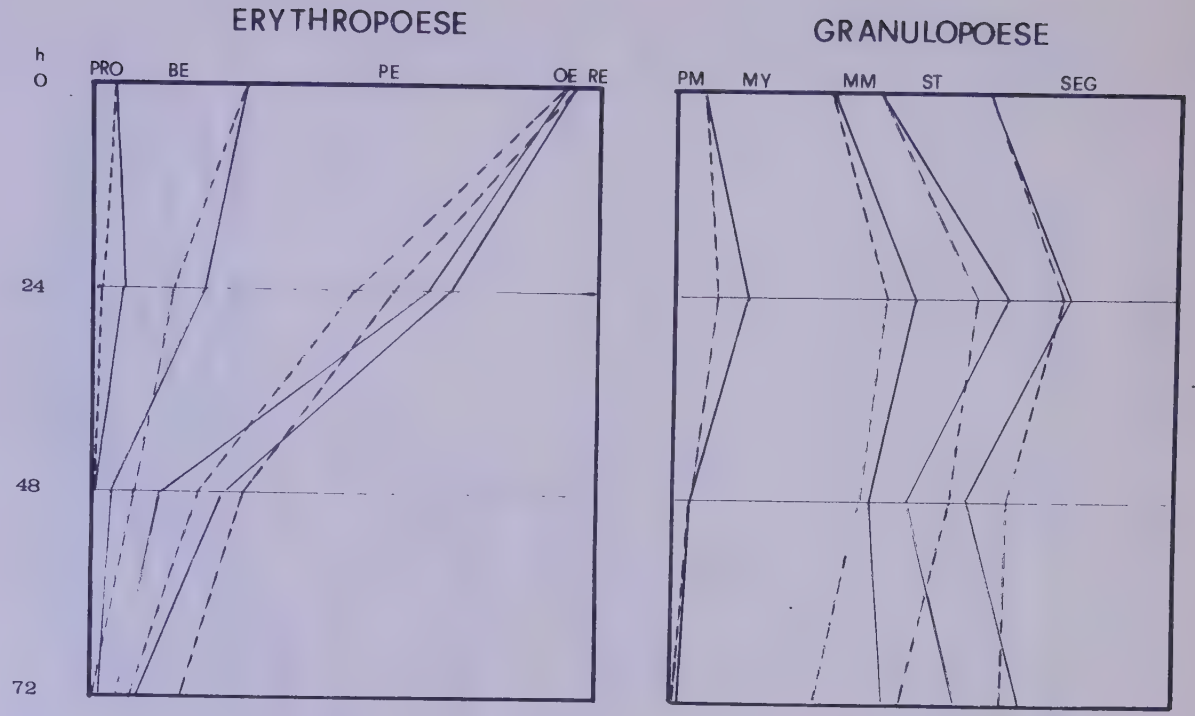

Abb. 4 Reifungskurven der Knochenmarkzellen in Versuch 3
(Erläuterung der Zeichen und Abkürzungen s.S. 9 u. 10)

Versuch 4 mit Knochenmark des Patienten
Reinhard M., 67 Jahre

Diagnose: Pyelonephritis bei Diabetes mellitus

Blutbild vor der Punktion:

Leukozyten	:	12900/ul
bas	:	1 %
eos	:	5
PM	:	-
MY	:	-
MM	:	-
ST	:	2
SEG	:	65
LYMPH	:	22
MONO	:	5

Erythrozyten:		3,53 mill/ul
Hb	:	10,8 g%
Hb_E	:	30,7 pg

Therapie vor der Punktion:

Lanicor(R)	2 X	0,25	mg
Daonil(R)	1 X	2,5	mg
Binotal(R)	3 X	0,1	g per os
Ferrlecit(R)	3 X	30	gtt

Reifungskurven: (Abb. 5)

Das Verhalten von Versuch und Kontrolle zeigt bei der Erythropoese kaum einen Unterschied. Auffallend ist, daß der nach 48 Stunden stark geschrumpfte Anteil der polychromatischen Erythroblasten nach 72 Stunden wieder zunimmt. Bei der Granulopoese zeigt die Kontrolle erst eine geringere, nach 72 Stunden eine stärkere Ausreifung als die Kultur mit Fremdserumzusatz.

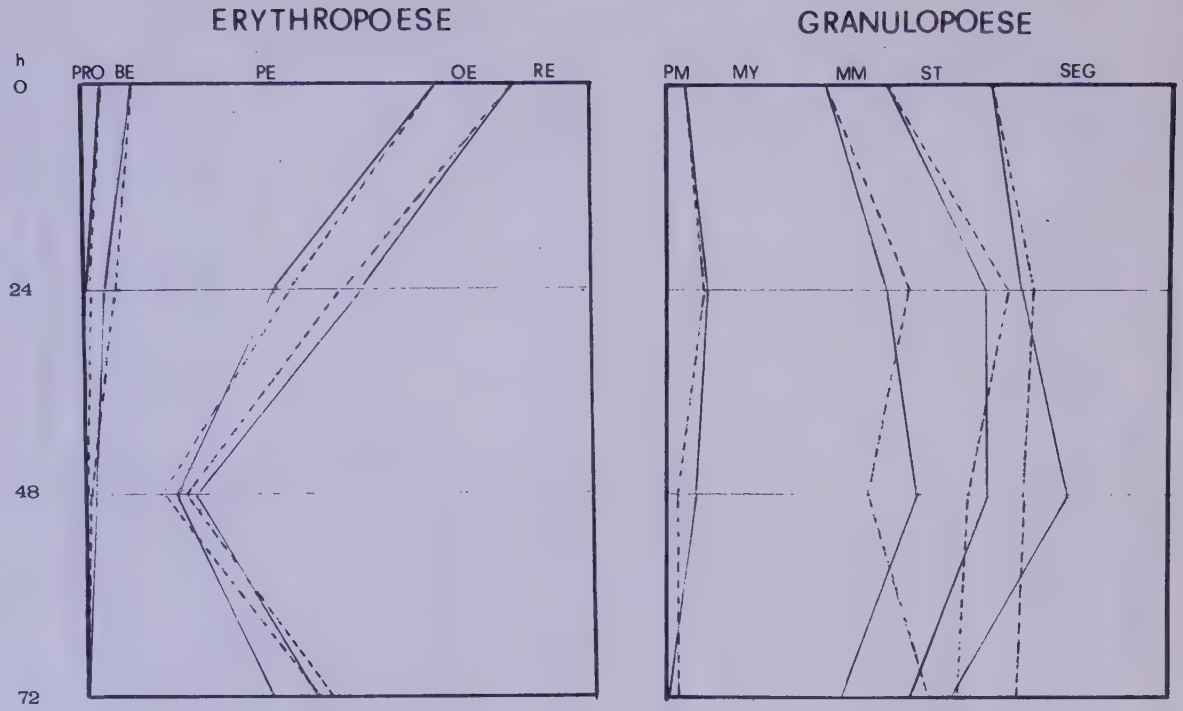

Abb. 5 Reifungskurven der Knochenmarkzellen in Versuch 4
(Erläuterung der Zeichen und Abkürzungen s.S. 9 u. 10)

Versuch 5 mit Knochenmark der Patientin
Gertrud H., 80 Jahre

Diagnose: Karzinom der Schilddrüse, Herzinsuffiziens, Bronchopneumonie, primär-chronische Polyarthritis.

Blutbild vor der Punktion:

Leukozyten	:	10800/ul
bas	:	2
eos	:	1
PM	:	-
MY	:	-
MM	:	-
ST	:	9
SEG	:	75
LYMPH	:	6
MONO	:	7
Erythrozyten	:	2,78 mill/ul
Hb	:	8,5 g%
Hb_E	:	30,5 pg

Therapie vor der Punktion:

Lanicor(R)	3 X	0,125	mg
Bisolvon(R)	2 X	4,0	mg
Ferrlecit(R)	1 X	10,0	ml
Refobacin(R)	2 X	40,0	mg

Reifungskurven: (Abb. 6)

Im Originalpräparat fällt bei der Erythropoese der große Anteil unreifer Zellen auf. Während nach 24 Stunden die Ausreifung in der Kontrolle schneller als in der Versuchsreihe vor sich geht, ist nach 48 Stunden der Anteil reifer Zellen in der Versuchsreihe vermehrt. Nach 72 Stunden zeigt sich in Versuch und Kontrolle übereinstimmend eine starke Ausreifung. Die Ausreifung der Granulozyten in den Kulturen mit Fremdserumzusatz ist gegenüber den Kontrollen nach 24 Stunden vermehrt, später jedoch vermindert.

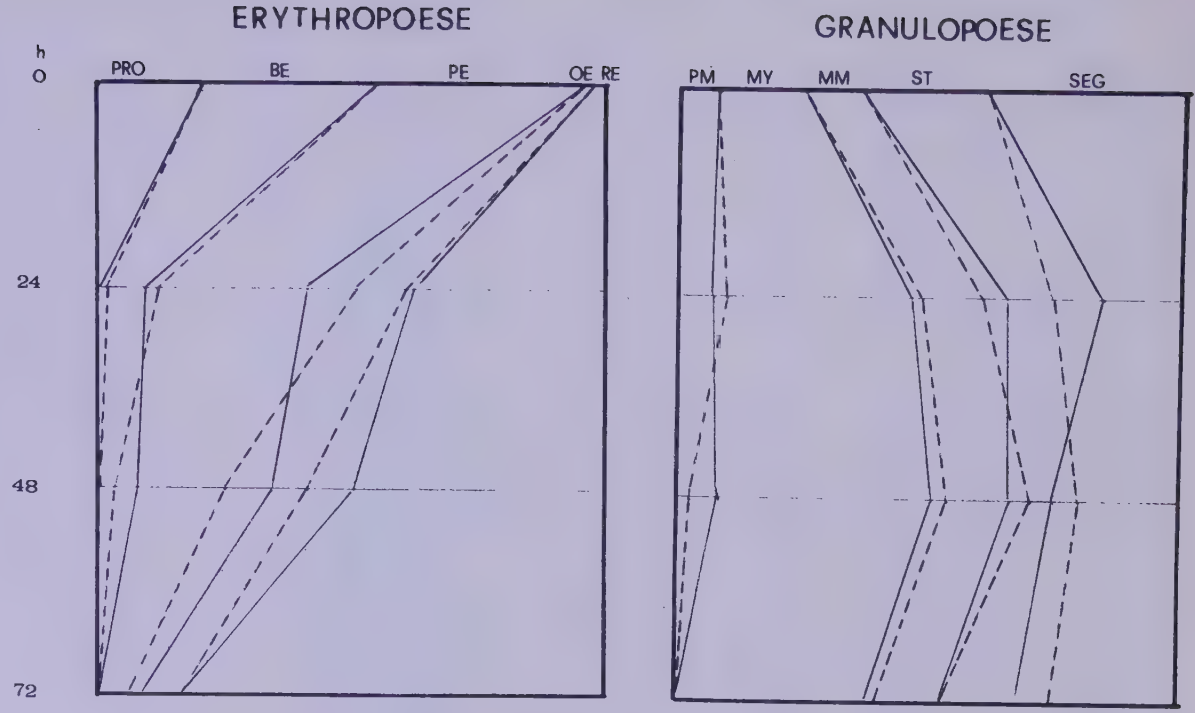

Abb. 6 Reifungskurven der Knochenmarkzellen in Versuch 5
(Erläuterung der Zeichen und Abkürzungen s.S. 9 u. 10)

Bei der Betrachtung der Reifungskurven fällt auf, daß bei jedem Fall mehr oder weniger starke, uneinheitliche Abweichungen der Versuchsreihe von der Kontrolle zu finden sind. Das ist auch darauf zurückzuführen, daß sich methodisch bedingte Veränderungen im Myelogramm nicht vollständig vermeiden lassen. Diese sind u.a. auf verschieden große Blutbeimischungen in den Markbröckchen zurückzuführen, die sich in den Reifungskurven als Links- bzw. Rechtsverschiebung darstellen. Weiterhin sind die Zellarten nicht gleichmäßig im Ausstrich verteilt; große Zellen und Mitosen findet man vermehrt am Rand, die Erythroblasten liegen häufig in "Nestern", auch ist die Beharrungstendenz im Zellverband nicht für alle Zellarten gleich.

Um zu vermeiden, daß Veränderungen in den einzelnen Reifungskurven, die durch Addition mehrerer möglicher Fehler entstanden sind, als Proliferationsänderungen im Sinne des Themas dieser Arbeit interpretiert werden, wurden die Mittelwerte aller Fälle gebildet und graphisch dargestellt. Für die Ergebnisse zu jedem Zeitpunkt wurden also für Versuch und Kontrolle je 10000 Zellen ausgewertet, insgesamt also 70000. Dadurch lassen sich methodisch bedingte Fehler weitgehend ausschließen. Eine Berechtigung zu diesem Vorgehen liegt vor, da es sich bei allen Fällen um ca. normales Knochenmark handelt.

Mittlere Reifungskurven (Abb. 7)

Die Ausreifung der Erythroblasten in den Versuchen stimmt mit der in den Kontrollen fast überein. Nach 48 Stunden sind kaum noch Proerythroblasten vorhanden, und bis 72 Stunden findet man auch basophile Erythroblasten nur noch vereinzelt. Die Anzahl der polychromatischen Erythroblasten nimmt im Laufe der Zeit ebenfalls ständig ab, so daß das Bild der roten Reihe nach 48, und besonders nach 72 Stunden, vor allem von reifen Erythroblasten bestimmt wird.

Auch bei der Granulopoese haben sich die Abweichungen, die bei den einzelnen Fällen zu beobachten waren, neutralisiert. Die Kurven von Versuch und Kontrolle zeigen nahezu gleiche Verläufe: Bei 24 Stunden eine Abnahme der reifen Zellen zugunsten der unreifen Vorstufen und darauf eine stetige Zunahme der reifen Zellen auf Kosten der unreifen Vorstufen. Nach 72 Stunden ist die Ausreifung unter Fremdserumzusatz etwas stärker.

Mitoseindices (Tab. 1, 2 - Abb. 8, 8a)

Insgesamt wurden in der erythropoetischen Reihe 76 Mitosen gezählt. Der Mitoseindex nahm im Laufe der Zeit von über 15 ‰ im Originalpräparat bis unter 5 ‰ nach 72 Stunden ab. Nach 24 und 72 Stunden war er in der Versuchsreihe größer als in der Kontrolle; nach 48 Stunden war er in der Kontrolle erheblich höher.

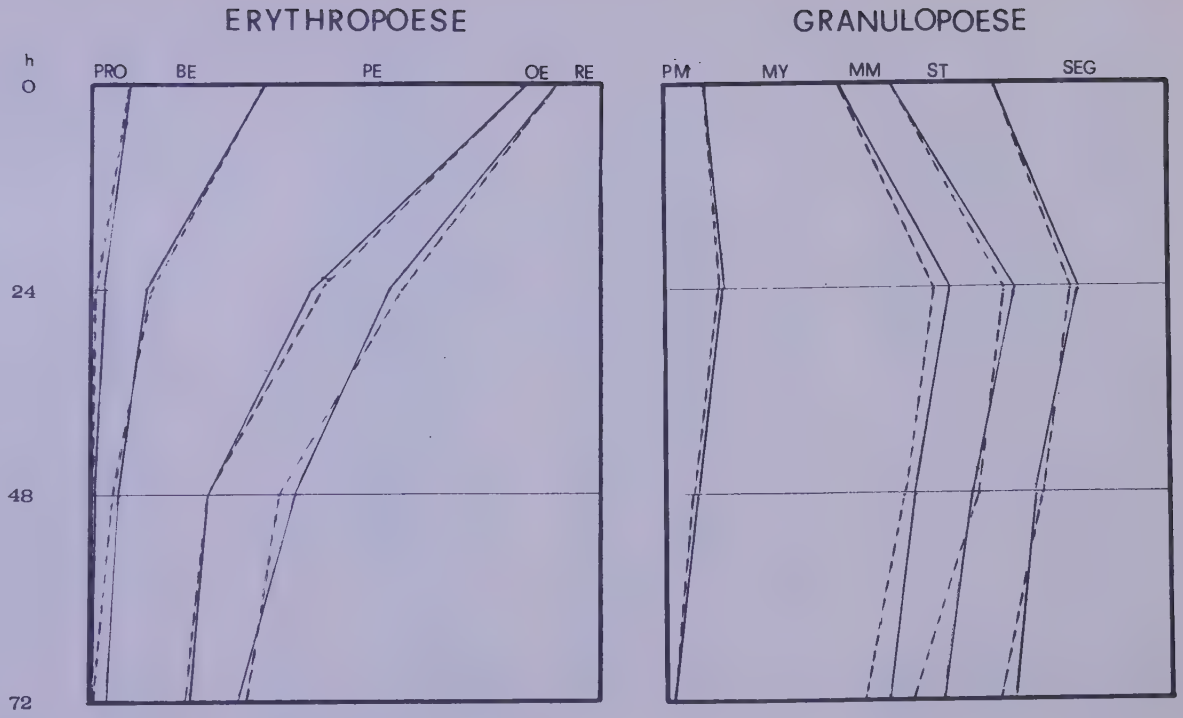

Abb. 7 Mittlere Reifungskurven der Versuche 1 - 5
(Erläuterung der Zeichen und Abkürzungen s.S. 9 u. 10)

	Original-Präparat	Versuch (Fremdserumzusatz)			Kontrolle (Eigenserumzusatz)		
Zeit (h)	0	24	48	72	24	48	72
Versuch 1	24,5	29,9	10,2	11,2	17,8	20,5	7,7
Versuch 2	14,2	15,6	16,8	9,0	21,5	15,9	15,8
Versuch 3	21,0	11,4	0,0	0,0	14,3	6,6	0,0
Versuch 4	11,2	12,2	11,2	0,0	13,3	14,3	0,0
Versuch 5	12,4	12,2	5,5	0,0	12,0	8,4	0,0
Mittelwert	16,7	16,3	8,7	4,0	15,8	13,2	2,7

Tabelle 1: Mitoseindices der Erythropoese im Originalpräparat, sowie nach 24, 48 und 72 Stunden bei Zusatz von Myeloseserum bzw. Eigenserum.

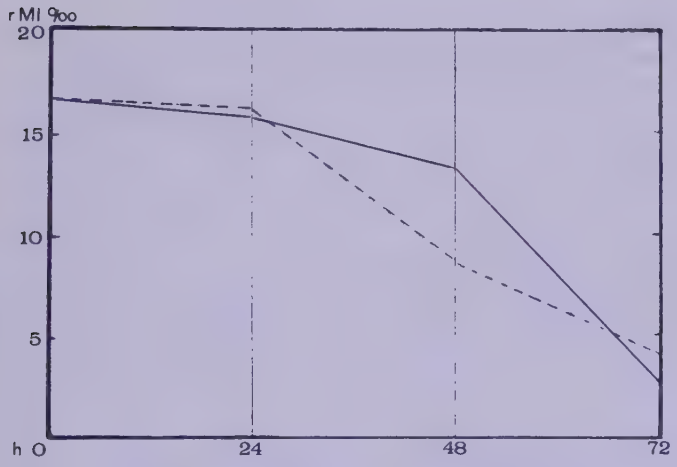

Abb. 8 Mitoseindices der Erythropoese (rMI) im Originalpräparat, sowie nach 24, 48 und 72 Stunden (Zeichenerklärung s.S. 9 u. 10)

	Original-Präparat	Versuch (Fremdserumzusatz)			Kontrolle (Eigenserumzusatz)		
Zeit (h)	0	24	48	72	24	48	72
Versuch 1	11,4	15,1	5,5	6,6	11,1	9,6	6,5
Versuch 2	12,0	9,9	7,2	7,5	13,0	7,2	7,4
Versuch 3	12,5	9,1	9,2	6,5	10,0	6,4	4,4
Versuch 4	11,4	13,3	7,9	8,6	13,2	7,7	8,2
Versuch 5	10,0	11,1	6,0	5,1	3,5	8,8	5,4
Mittelwert	11,5	11,7	7,2	6,8	12,2	7,9	6,4

Tabelle 2: Mitoseindices der Granulopoese im Originalpräparat, sowie nach 24, 48 und 72 Stunden bei Zusatz von Myeloseserum bzw. Eigenserum

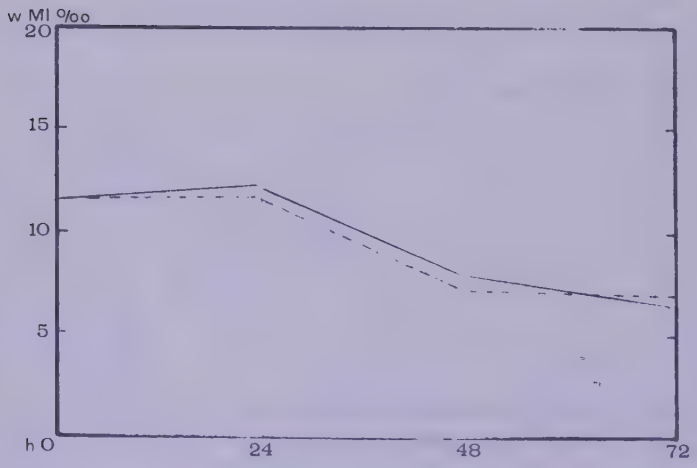

Abb. 8 a Mitoseindices der Granulopoese (wMI) im Originalpräparat, sowie nach 24, 48 und 72 Std. (Zeichenerklärung s.S. 9 u. 10)

In der Granulopoese wurden insgesamt 185 Mitosen gezählt. Der Mitoseindex im Originalpräparat von 11,5 ‰ steigt bis 24 Stunden leicht an, um dann, bis zu den 72-Stunden-Präparaten, auf Werte unter 7 ‰ zu sinken. Die Werte von Versuch und Kontrolle stimmen dabei fast überein.

G/E-Indices (Tab. 3, Abb. 9)

Auch bei den G/E-Indices lassen sich keine eindeutigen Unterschiede zwischen Versuch und Kontrolle ausmachen. Nach 24 und 48 Stunden ist er bei der Versuchsreihe im Vergleich zur Kontrolle leicht erniedrigt und nach 72 Stunden leicht erhöht.

Verteilung der Mitosephasen (karyologische Kurven) (Abb.10)

In der Erythropoese zeigen die Mitosephasen für Versuch und Kontrolle übereinstimmend das Vorherrschen der Metaphasen. Bei der Versuchsreihe sind frühe und späte Metaphasen in gleicher Anzahl vorhanden, bei der Kontrolle zeigt sich ein starkes Überwiegen der frühen Metaphase. Der Prozentsatz der Prophasen ist in der Versuchsreihe etwas höher. Die späten Mitosephasen zeigen nur geringe Unterschiede.

Bei der Granulopoese zeigen die karyologischen Kurven für die Versuchsreihe einen erhöhten prozentualen Anteil der späten Metaphase und Anaphase, während die anderen Phasen leicht vermindert sind.

	Original-Präparat	Versuch (Fremdserumzusatz)			Kontrolle (Eigenserumzusatz)		
Zeit (h)	0	24	48	72	24	48	72
Versuch 1	3,1	2,3	2,8	2,9	2,7	5,8	2,1
Versuch 2	4,4	2,3	4,8	4,3	2,0	3,2	3,5
Versuch 3	4,6	2,2	3,5	2,8	4,4	2,2	2,3
Versuch 4	1,6	1,8	2,9	2,7	2,2	1,5	3,9
Versuch 5	2,7	1,4	1,1	1,5	1,3	1,4	1,4
Mittelwert	3,3	2,0	2,6	2,8	2,5	2,8	2,2

Tabelle 3: G/E-Indices im Originalpräparat, sowie nach 24, 48 und 72 Stunden bei Zusatz von Myeloseserum bzw. Eigenserum

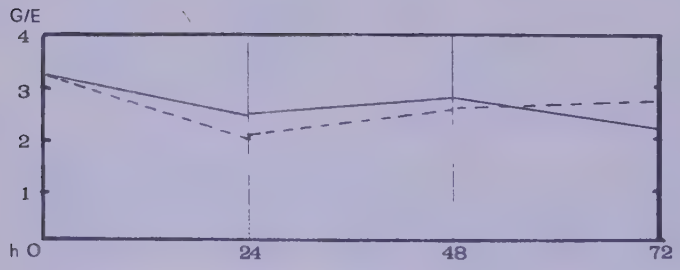

Abb. 9 G/E-Indices im Originalpräparat, sowie nach 24, 48 und 72 Stunden

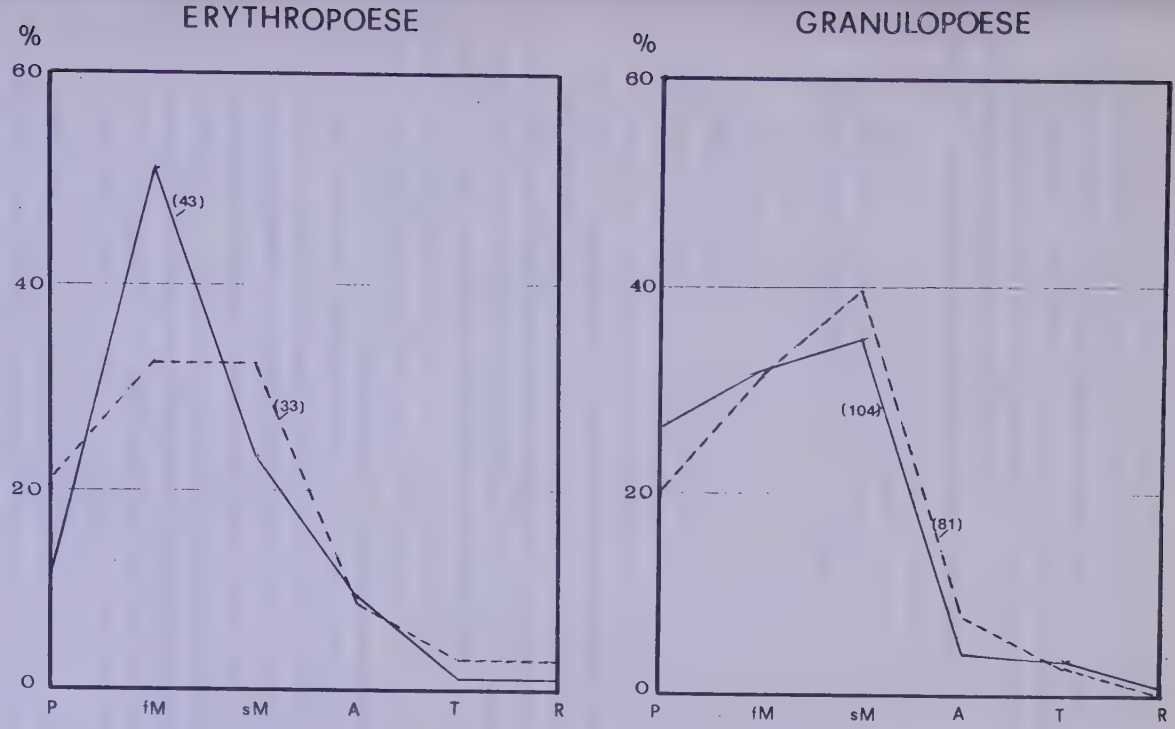

Abb. 10 Karyologische Kurven der Erythro- und Granulopoese

Ordinate: Anzahl der Mitosephasen in Prozent
Abszisse: Bezeichnung der Mitosephase
in Klammern: Gesamtanzahl der Mitosephasen in Versuch und Kontrolle

(Erläuterung der Abkürzungen s.S. 9 u. 10)

IV Diskussion

Die Proliferationskinetik teilt sich in die Regeneration mit Zellmultiplikation und in die Reifung oder Differenzierung. Als Parameter für die Reifung soll die mittlere Reifungskurve (Abb. 7) dienen. Da keine Ausschwemmung erfolgt, würde sich eine angeregte Reifung als Vermehrung der reifen Zellen darstellen, eine verzögerte als Vermehrung der unreifen.

Hinweise für die Regeneration werden den Mitoseindices (Tab. 1, 2 - Abb. 8, 8a) und den karyologischen Kurven (Abb. 10) entnommen.

Aus den G/E-Indices (Tab. 3 - Abb. 9) erhält man Aufschlüsse, ob die Proliferation der Zellen der Erythropoese oder die der Granulopoese durch den Zusatz stärker verändert wird.

Bei der Erythropoese stimmt die Ausreifung von Versuch und Kontrolle nahezu überein (Abb. 7). Sie ähnelt den Ergebnissen, die bei gleicher Versuchsanordnung für ca. normales Knochenmark gefunden wurden (BOLL 1, 3 GERHARDT). Auch bei der Granulopoese ist die Ausreifung der Zellen bei Versuch und Kontrolle fast gleich. Insgesamt kann man von einer angeregten Granulopoese sprechen, wie sie BOLL (3) in Zusammenhang mit peripheren Leukozytosen gefunden hat. Das stimmt mit diesen Ergebnissen überein, bei denen die durchschnittliche Leukozytenzahl im Blut bei 9900/ul liegt. Eine verzögerte Ausreifung, wie sie Boll (3) bei der chronischen Myelose besonders nach 72 Stunden gefunden hat, wird durch den Zusatz des Serums einer beginnenden chronischen Myelose nicht hervorgerufen, vielmehr ist die Ausreifung der Granulozyten nach 72 Stunden etwas verstärkt.

Auch hinsichtlich der Regeneration lassen sich keine relevanten Unterschiede zwischen Versuch und Kontrolle feststellen. Der Mitoseindex der Versuchsreihe (Tab. 1,

Abb. 8) ist in der Erythropoese nach 24 und 72 Stunden leicht erhöht. Der - gegenüber der Kontrolle - erheblich erniedrigte Wert nach 48 Stunden ist auf die besonders geringe Anzahl der Mitosen zu diesem Zeitpunkt zurückzuführen (9 im Versuch gegenüber 12 in der Kontrolle). In der Granulopoese stimmen die Mitoseindices von Versuch und Kontrolle fast überein (Tab. 2, Abb. 8a). Sie zeigen ein Maximum nach 24 Stunden und haben nach 72 Std. ihren tiefsten Wert erreicht. Insgesamt sind die Mitoseindices hoch, liegen aber im Normbereich (BOLL (3, 7), KILLMANN, ROHR). Eine Erniedrigung des Mitoseindex, wie für die chronische Myelose angegeben wird (BOLL (3), FLIEDNER, MAUBACH, ROHR, ROSIN), wurde durch den Zusatz von Serum eines Kranken mit einer beginnenden chronischen Myelose nicht beobachtet.

Auch aus den karyologischen Kurven (Abb. 10) läßt sich keine Änderung der Proliferationskinetik ablesen. Nach FIESCHI, sowie nach BEGEMANN und HEMMERLE, spricht eine Vermehrung der Prophasen bei Verminderung der Endphasen für eine Steigerung der Proliferationsaktivität. Eine Verminderung der Prophasen bei Vermehrung der Endphasen soll entsprechend eine langsamere Zellvermehrung zu erkennen geben.

Weder für die Erythropoese noch für die Granulopoese läßt sich eine Veränderung der karyologischen Kurve im Sinne einer Betonung der Pro- oder der Endphasen feststellen. Eine Prophasenvermehrung, wie sie FIESCHI und MAUBACH in der Granulopoese chronischer Myelosen feststellten, wird nicht hervorgerufen; im Vergleich zur Kontrolle ist die Anzahl der Prophasen leicht erniedrigt. Die großen Unterschiede, die sich innerhalb der Mittelphasen bei der Erythropoese zeigen, lassen wegen der geringen Anzahl der Mitosen keine Deutung zu.

Die Wucherung leukozytärer Zellen bei der chronischen Myelose äußert sich im erhöhten G/E-Index. In den vorliegenden Fällen ist der G/E-Index nur nach 72 Stunden gering erhöht; nach 24 und 48 Stunden ist er durch den Zusatz sogar leicht erniedrigt (Tab. 3, Abb. 9).

Aus der Gesamtheit der Ergebnisse ist abzuleiten, daß durch die Einwirkung von Serum einer chronisch-myeloischen Leukämie im Anfangsstadium eine Beeinflussung der Proliferation von normalem menschlichen Knochenmark bei unserer Versuchsanordnung nicht nachzuweisen war.

Es wäre sinnvoll, ähnliche Versuche wie unsere noch einmal mit Serum eines Kranken mit chronischer myeloischer Leukämie im fortgeschrittenen Stadium anzustellen. Dabei sollte darauf geachtet werden, daß die Krankheit zum Zeitpunkt der Serumgewinnung keine Remission zeigt, da REISNER jr (25) mit während einer Remission gewonnenem Serum auch keine Stimulierung der Granulopoese beobachten konnte.

Das bei der chronischen Myelose gestörte Gleichgewicht zwischen Wachstumsförderung und -hemmung ist wohl auf eine verminderte Wirkung des Granulozytenchalons zurückzuführen, das als Mitoseinhibitor die Granulozytenzahl regelt (RYTÖMAA u. KIVINIEMI nach PAUKOVITS; BULLOUGH u. RYTÖMAA). Möglicherweise liegen ähnliche Verhältnisse vor, wie RYTÖMAA und KIVINIEMI (28, 29, 30) nach Implantation von SHAYS myelozytischer Chloroleukämie auf Ratten beobachteten: Chloroleukämische Zellen stellten weniger Chalon her als gesunde und schwemmten es vermehrt aus; so betrug die intrazelluläre Chalonkonzentration nur 1/10 - 1/20 der Norm. Zugabe externen homologen Chalons führte in vitro und in vivo eine Mitoseinhibition herbei. Häufig konnte eine Regression und Abheilung der Chlorome erzielt werden.

Bei der chronischen myeloischen Leukämie ist die Chalonkonzentration im Serum möglicherweise gegenüber der Norm vermindert. OSGOOD beobachtete, daß leukämische Zellen nicht gut im unverdünnten Normalserum wachsen; bei Verdünnung des Serums mit Salzlösung erhöhte sich die Teilungsrate und auch die Lebensdauer der Zellen.

WETHERBY - MEIN und COTTOM gelang es, durch Transfusionen von frischem Blut gesunder Spender vorübergehende Remissionen bei Myelosekranken zu erreichen. Beide Beobachtungen, wie auch die schon beschriebenen von REISNER jr (25), wären durch einen verminderten Chalongehalt im Serum von Kranken mit chronischer myeloischer Leukämie zu erklären.

V Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Einwirkung von Serum eines Patienten mit beginnender chronischer myeloischer Leukämie auf die Proliferation menschlichen Knochenmarkes in vitro.

Das durch Sternalpunktion gewonnene Mark wurde auf einem Coagulum mit 40 % Leukämieserum und zur Kontrolle mit 40 % autologem Serum beschickt. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde das auf Coagulumkulturen gezüchtete Mark ausgestrichen und durch Differentialzählung ausgewertet. Aufschlüsse über Proliferationsänderungen sollten aus den Reifungskurven, den Mitoseindices, den G/E-Indices und aus den karyologischen Kurven erhalten werden.

Beim Vergleich der Ergebnisse von Versuch und Kontrolle ergaben sich keine Unterschiede, die auf eine veränderte Proliferation des Knochenmarkes unter Einwirkung von Serum einer chronischen myeloischen Leukämie im Anfangsstadium schließen lassen.

Literaturverzeichnis

1. Begemann, H. u. Hemmerle, W. — Die Mitosefähigkeit des menschlichen Knochenmarkes und ihre Beeinflussung durch cytostatische Substanzen. Kli.Wo. 57, 530. (1949)

2. Boll, I. — Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro. Fol.Haemat.Neue Folge 3, 58. (1958)

3. Boll, I. — Granulozytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York. (1966)

4. Boll, I. Mersch, G. Schoen, S. Göttke, U. Boxheimer, D. u. Lücke, G. — Hormoneinwirkung auf die Proliferationskinetik humaner Knochenmarkkulturen. Kli.Wo. 11, 608. (1968)

5. Boll, I. u. Mersch, G. — Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro. Blut 17, 193. (1968)

6. Boll, I. u. Mersch, G. — Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulopoese in vitro. Blut 19, 257. (1969)

7. Boll, I.
Die Proliferationskinetik der normalen und leukämischen Granulozytopoese.
Fol. Haemat. 91, 172. (1969)

8. Bullough, W.S. u. Rytömaa, T.
Mitotic Homeostasis.
Nature 205, 573 (1965)

9. Ellermann, V. u. Bang, O.
Experimentelle Leukämie bei Hühnern II.
Z.f.Hyg. 63, 231. (1909)

10. Fieschi, A.
Semiologie des Knochenmarks.
Erg.d.Inn.Med.u.Kinderheilkd. 59, 396. (1941)

11. Fliedner, T.M. Cronkite, E.P. Bond, V.P. Rubini, J.R. and Andrews, G.
The Mitotic Index of Human Bone Marrow in Healthy and Irradiated Human Beings.
Acta haemat. 22, 65. (1959)

12. Fly, F. u. Graffi, A.
Untersuchungen zur hämatologischen Aufsplitterung der durch das Virus der myeloischen Leukämie der Maus induzierten Leukosen.
Acta haemat. 33, 139. (1965)

13. Furth, J. and Furth, O.B.
Neoplastic Diseases Produced in Mice by General Irradiation with X-Rays.
Am.J.o.Cancer 28, 54. (1936)

14. Furth, J. and Kahn, M.C.
The Transmission of Leukaemia of Mice with a Single Cell.
Am.J.o.Cancer 31, 276. (1937)

15. Gerhardt, D.
Wirkung von leukozytischem menschlichen Plasma auf die Proliferation menschlichen Knochenmarkes in vitro. Diss. Berlin (1972)

16. Heilmeyer, L.
Blut und Blutkrankheiten. in: Handbuch der inneren Medizin, Bd. 2, Springer Verlag. (1951)

17. Hoshino, T.
Kato, H.
Finch, S.C.
Hrubec, Z.
Leukemia in Offspring of Atomic Bomb Survivors. Blood 30, 720. (1967)

18. Killmann, S.A.
Cronkite, E.P.
Fliedner, T.M.
Bond, V.P.
Mitotic Indices of Human Bone Marrow Cells. I. Number and Distribution of Mitosis. Blood 19, 743. (1962)

19. Levine, P.H.
Horoszewicz, J.S.
Grace, J.T.
Chai, L.S.
Ellison, R.R.
Holland, J.F.
Relationship between Clinical Status of Leukemic Patients and Virus - Like Particles in Their Plasma. Cancer 20, 1563. (1967)

20. Maubach, E.
Mitose - Häufigkeit und Mitose - Phasenverteilung bei der unbehandelten chronisch-myeloischen Leukämie. Diss. Berlin (1963)

21. Mieske, K.
Die Wirkung von Zytosin - Arabinosid auf die Proliferation von menschlichem Knochenmark in vitro. Diss. Berlin (1973)

22. Osgood, E.E. u. Brooke, J.H. — Leukozytes from Human Leukemic Blood by Application of Gradient Principles. Blood 10, 1010. (1955)

23. Paukovits, W. — Die Regulation der Zellteilung in normalen und malignen Geweben. Krebsarzt 4, 221. (1969) (Wien)

24. Reisner, Jr., E.H. — Effects of Humoral and Hormonal Factors on Hemopoises in Vitro. Blood 20, 109. (1962)

25. Reisner, Jr., E.H. — Tissue Culture of Bone Marrow. III. Myelostimulatory Factors in Serum of Patients with Myeloproliferative Diseases. Cancer 20, 1679. (1967)

26. Rohr, K. — Das menschliche Knochenmark. G. Thieme Verlag, Stuttgart (1960)

27. Rosin, A. and Goldhaber, G. — A Comperative Analysis of the Mitotic Activity of Normal and Leukemic Myelocytes in Rats with and without Urethane Treatment. Acta haemat. 20, 318. (1958)

28. Rytömaa, T. u. Kiviniemi, K. — Control of DNA Duplication in Rat Chloroleukaemia by means of the Granulocytic Chalone. Europ. J. Cancer 4, 595. (1968)

29. Rytömaa, T. u. Kiviniemi, K. — Control of Cell Production in Rat Chloroleukaemia by means of the Granulocytic Chalone. Nature 220, 136. (1968)

30. Rytömaa, T. u. Kiviniemi, K. — Chloroma Regression induced by the Granulocytic Chalone. Nature 222, 995. (1969)

31. Schwartz, S.O. and Ehrlich, L. — The Relationship of Polycythemia Vera to Leukemia; a Critical Review. Acta haemat. 4, 129. (1950)

32. Storti, E. u. Mauri, C. — Die chronischen Myelosen. in: Handbuch d.ges. Hämatologie, Bd. 4, Teil 2. Urban & Schwarzenberg, München (1964)

33. Wetherby-Mein, G. u. Cottom, D.G. — Brit.J.Haemat. 2, 25. (1956)

Frau Professor Dr. med. Irene Boll danke ich herzlich für ihre ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei dieser Arbeit.

Unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Lebenslauf

Am 21. 10. 1946 wurde ich als Sohn des damaligen Journalisten und heutigen Senatsdirektors Achim Helge Freiherr von Beust und seiner Ehefrau Hanna, geborene Wolff, in Hamburg geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule kam ich 1957 auf die Walddörferschule in Hamburg-Volksdorf, an der ich 1967 die Reifeprüfung ablegte.

Nach einem halben Jahr beim Bundesgrenzschutz begann ich im Oktober 1967 das Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin. Hier bestand ich im September 1968 die naturwissenschaftliche und im April 1970 die ärztliche Vorprüfung.

Das medizinische Staatsexamen legte ich im März 1974 ab. Seit 1. Juli 1974 arbeite ich als Medizinal-assistent.